

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003175

International filing date: 25 February 2005 (25.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-050082  
Filing date: 25 February 2004 (25.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

09. 3. 2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 4 年    2 月 2 5 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 4 - 0 5 0 0 8 2  
Application Number:

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 0 5 0 0 8 2

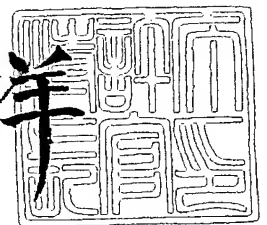
出      願      人  
Applicant(s):

国立大学法人岐阜大学  
独立行政法人産業技術総合研究所  
松下環境空調エンジニアリング株式会社

2 0 0 5 年    4 月 1 9 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号    出証特 2 0 0 5 - 3 0 3 5 3 3 8

【書類名】 特許願  
【整理番号】 8009150035  
【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特許出願  
【提出日】 平成16年 2月25日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 岐阜県岐阜市柳戸 1 - 1 岐阜大学農学部内  
    【氏名】 高見澤 一裕  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所  
    つくばセンター内  
    【氏名】 岩橋 均  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府吹田市垂水町 3 丁目 2 8 番 3 3 号 松下環境空調エンジニアリング株式会社内  
    【氏名】 伊藤 善孝  
【特許出願人】  
    【持分】 40/100  
    【識別番号】 391012257  
    【氏名又は名称】 岐阜大学長  
【特許出願人】  
    【持分】 35/100  
    【識別番号】 301021533  
    【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所  
【特許出願人】  
    【持分】 25/100  
    【識別番号】 591261336  
    【氏名又は名称】 松下環境空調エンジニアリング株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 110000040  
    【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ  
    【代表者】 池内 寛幸  
    【電話番号】 06-6135-6051  
【持分の割合】 25/100  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 139757  
    【納付金額】 5,250円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項 1】

下記 (1) から (4) のいずれかのポリヌクレオチド。

(1) 配列番号 1 から 17 のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

(2) 前記 (1) のポリヌクレオチドの塩基配列の 1 個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記 (1) のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(3) 前記 (1) のポリヌクレオチドの塩基配列の 1 個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記 (1) のポリヌクレオチドとの相同性が 90% 以上であるポリヌクレオチド。

(4) 前記 (1) から (3) のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

## 【請求項 2】

下記 (5) から (8) のいずれかのポリヌクレオチド。

(5) 配列番号 19 から 105 のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

(6) 前記 (5) のポリヌクレオチドの塩基配列の 1 個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記 (5) のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(7) 前記 (5) のポリヌクレオチドの塩基配列の 1 個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記 (1) のポリヌクレオチドとの相同性が 90% 以上であるポリヌクレオチド。

(8) 前記 (5) から (7) のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドからなる DNA プローブであって、前記 (1) の配列番号が配列番号 1 であり、前記 (5) の配列番号が配列番号 19 から 25 のいずれかである、*バクテリア デハロスピリウム マルチヴォボランス (Dehalospirillum multivorans)* を検出するための DNA プローブ。

## 【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドからなる DNA プローブであって、前記 (1) の配列番号が配列番号 2 であり、前記 (5) の配列番号が配列番号 26 から 30 のいずれかである、*バクテリア デスルフィトバクテリウム フラピエリ (Desulfitobacterium frappieri)* を検出するための DNA プローブ。

## 【請求項 5】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドからなる DNA プローブであって、前記 (1) の配列番号が配列番号 3 であり、前記 (5) の配列番号が配列番号 31 から 35 のいずれかである、*バクテリア アクチノマイセタレス Sm-1 (ロドコッカス sp. Sm-1)* (*Actinomycetales Sm-1 (Rhodococcus sp. Sm-1)*) を検出するための DNA プローブ。

## 【請求項 6】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドからなる DNA プローブであって、前記 (1) の配列番号が配列番号 4 であり、前記 (5) の配列番号が配列番号 36 から 40 のいずれかである、*バクテリア ロドコッカス ロドコッカス (Rhodococcus rhodococcus)* を検出するための DNA プローブ。

## 【請求項 7】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドからなる DNA プローブであって、前記 (1) の配列番号が配列番号 5 であり、前記 (5) の配列番号が配列番号 41 から 45 のいずれかである、*バクテリア キサントバクター フラバス (Xanthobacter flavus)* を検

出するためのDNAプローブであって、およびの塩基配列に由来する請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブ。

【請求項8】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号6であり、前記(5)の配列番号が配列番号46から48のいずれかである、バクテリア マイコバクテリウム L1 (Mycobacterium L1)を検出するためのDNAプローブ。

【請求項9】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号7であり、前記(5)の配列番号が配列番号49から53のいずれかである、バクテリア デスルフォミクロビウム ノルベギカム (デスルフォヴィブリオ バキュラタス) (Desulfomicrobium norvegicum (Desulfovibrio baculatus))を検出するためのDNAプローブ。

【請求項10】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号8であり、前記(5)の配列番号が配列番号54から57のいずれかである、バクテリア デスルフィトバクテリウム デハロゲナンス (Desulfitobacterium dehalogenans)を検出するためのDNAプローブ。

【請求項11】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号9であり、前記(5)の配列番号が配列番号58から62のいずれかである、バクテリア デスルフィトバクテリウム ハフニエンス (Desulfitobacterium hafniense)を検出するためのDNAプローブ。

【請求項12】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号10であり、前記(5)の配列番号が配列番号63から68のいずれかである、バクテリア クロストリジウム フォルミコアセチカム (Clostridium formicoaceticum)を検出するためのDNAプローブで。

【請求項13】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号11であり、前記(5)の配列番号が配列番号69から74のいずれかである、バクテリア デスルフロノナス クロロエテニカ (Desulfuromonas chloroethenica)を検出するためのDNAプローブ。

【請求項14】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号12であり、前記(5)の配列番号が配列番号75から79のいずれかである、バクテリア アセトバクテリウム ウッディ DSM 1030 (Acetobacterium woodii DSM 1030)を検出するためのDNAプローブ。

【請求項15】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号13であり、前記(5)の配列番号が配列番号80から86のいずれかである、バクテリア デハロバクター レストリクタス (Dehalobacter restrictus)を検出するためのDNAプローブ。

【請求項16】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)の配列番号が配列番号14であり、前記(5)の配列番号が配列番号87から91のいずれかである、バクテリア デスルフィトバクテリウム sp. PCE1 (Desulfitobacterium sp. strain PCE1)を検出するためのDNAプローブ。

【請求項17】

請求項1または2に記載のポリヌクレオチドからなるDNAプローブであって、前記(1)

1) の配列番号が配列番号 15 であり、前記 (5) の配列番号が配列番号 92 から 96 のいずれかである、バクテリア デスルフィトバクテリウム フラピエリ TCE1 (Desulfotobacterium frappieri TCE1) を検出するための DNA プローブ。

【請求項 18】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドからなる DNA プローブであって、前記 (1) の配列番号が配列番号 16 であり、前記 (5) の配列番号が配列番号 97 から 99 のいずれかである、バクテリア アセトバクテリウム ウッディ DSM 2396 (Acetobacterium woodii DSM 2396) を検出するための DNA プローブ。

【請求項 19】

請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチドからなる DNA プローブであって、前記 (1) の配列番号が配列番号 17 であり、前記 (5) の配列番号が配列番号 100 から 105 である、バクテリア デスルフォモニル タイドジェイ DCB-1 (Desulfomonile tiedjei DCB-1) を検出するための DNA プローブ。

【請求項 20】

請求項 3 から 19 のいずれかに記載の DNA プローブが少なくとも 1 つ基板上に固定された DNA マイクロアレイ。

【請求項 21】

請求項 3 から 19 に記載の DNA プローブが少なくとも 2 つ以上固定され、少なくとも 2 種類以上の前記バクテリアを同時に検出できる請求項 20 に記載の DNA マイクロアレイ。

【請求項 22】

バクテリアを検出するためのキットであって、請求項 3 から 19 に記載の DNA プローブの少なくとも 1 つの DNA プローブと、前記 DNA プローブにハイブリダイズすることで検出されるターゲットを調製するための遺伝子増幅用プライマーおよび遺伝子増幅用試薬とを含むバクテリアの検出キット。

【請求項 23】

バクテリアを検出するためのキットであって、請求項 20 または 21 に記載の DNA マイクロアレイと、前記 DNA プローブにハイブリダイズすることで検出されるターゲットを調製するための遺伝子増幅用プライマーおよび遺伝子増幅用試薬とを含むバクテリアの検出キット。

【請求項 24】

バクテリアの検出方法であって、検出対象試料から調製した核酸から遺伝子増幅方法によりターゲットを調製し、前記ターゲットと請求項 3 から 19 に記載の DNA プローブに少なくとも 1 つとをハイブリダイズさせることにより前記試料中のバクテリアを検出する方法。

【請求項 25】

バクテリアの検出方法であって、検出対象試料から調製した核酸から遺伝子増幅方法によりターゲットを調製し、前記ターゲットと請求項 20 または 21 に記載の DNA マイクロアレイとをハイブリダイズさせることにより前記試料中のバクテリアを検出する方法。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】微生物検出用ポリヌクレオチド

## 【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物の検出用ポリヌクレオチドに関する。

## 【背景技術】

【0002】

テトラクロロエチレン（PCE）およびトリクロロエチレン（TCE）をはじめ、各種の有機塩素化合物による地下水や土壌の汚染は、世界共通の深刻な問題であり、しばしば、新聞紙上等のマスコミでも詳細に取り上げられ、これらの物質による環境汚染を修復するための技術開発が社会的に強く要求されている。

【0003】

汚染環境修復技術として、物理化学的方法と生物的方法とがあげられるが、低濃度汚染の修復には、微生物を用いる生物的環境修復方法（バイオレメディエーション）が特に適している。バイオレメディエーションは、土壌の掘削が必要なく、建造物下の環境修復も容易であること、低コストで環境負荷が少ないことから、その実用化への期待が大きい。

【0004】

バイオレメディエーションの方式には、汚染された土壌や地下水に元来生息する微生物に、例えば、各種栄養物質等を供給し、微生物の持つ環境汚染物質の分解除去能力を増強させる方式（バイオスティミュレーション）と、環境汚染物質を分解除去する能力を持つ微生物を汚染環境に直接導入する方式（バイオオーギュメンテーション：例えば、特許文献1参照）とがある。TCEに汚染された地下水の環境修復を、バイオスティミュレーションとバイオオーギュメンテーションにより行い、優れた成果をあげた例もある。

【0005】

バイオレメディエーションを適用するにあたり、その汚染サイトがバイオスティミュレーション可能か、あるいは、系外から汚染物質分解能力を持つ微生物を導入するバイオオーギュメンテーションを適用しなければならないかの判定を迅速に行うことが望まれている（例えば、特許文献2参照）。

【特許文献1】特開2003-154332号公報

【特許文献2】特開2000-079000号公報

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本発明は、バイオレメディエーションの適用において、どの方式を適用すべきか判定可能とするポリヌクレオチドの提供を目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

【0007】

前記目的を達成するために、本発明のポリヌクレオチドは、下記（1）から（4）のいずれかのポリヌクレオチドである。

（1）配列番号1から17のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

（2）前記（1）のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記（1）のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

（3）前記（1）のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記（1）のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

（4）前記（1）から（3）のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

## 【発明の効果】

## 【0008】

本発明者らは、PCEの分解に関連する嫌気性バクテリアの検出方法について鋭意研究を重ねた結果、前記バクテリアは、それぞれ、リボゾーマルDNAの16S-23S Internal Transcribed Spacer (ITS)領域に多様性に富む特有の塩基配列を有することを見出した。そして、この塩基配列をDNAプローブとして、例えば、DNAチップ等の遺伝子検出技術に利用することによって、前記バクテリアの迅速な検出が可能であることを見出し、本発明に到達した。

## 【0009】

なお、本発明のポリヌクレオチドにおける配列番号1から17の塩基配列は、後述するPCE分解に関与する17種類の嫌気性バクテリアのITS配列であり、本発明者らが初めて決定した配列である。

## 【0010】

本発明のポリヌクレオチドからなるポリヌクレオチドをDNAプローブとして使用すれば、例えば、汚染環境中の嫌気性PCE分解関連バクテリアの少なくとも17種を迅速に検出できる。また、現在報告のある嫌気性PCE分解関連バクテリア18種の残りの1種のバクテリアについても公知のITS配列からDNAプローブを作製でき、これ併用すれば、前記18種すべてを一度に検出することが可能となる。また、前記DNAプローブを用いて、例えば、DNAマイクロアレイを作製すれば、前記検出がより一層簡便かつ迅速にすることができる。

## 【0011】

したがって、本発明のポリヌクレオチドによれば、汚染環境中のPCE分解関連バクテリアを迅速に検出し、前記汚染環境が有するPCEおよびその脱塩素化物を除去する能力を知ることができるから、例えば、バイオレメディエーションにおけるバイオスティミュレーションが可能か否かの判定が容易にできる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0012】

本発明のポリヌクレオチドは、上記(1)から(4)のポリヌクレオチドの一部であるポリヌクレオチドであってもよく、例えば、下記(5)から(8)のいずれかのポリヌクレオチドであってもよい。

(5) 配列番号19から105のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

(6) 前記(5)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(5)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(7) 前記(5)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

(8) 前記(5)から(7)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

## 【0013】

本発明のDNAプローブは、下記AからQのいずれかのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

A: デハロスピリウム マルチヴォボランス (*Dehalospirillum multivorans*)

B: デスルフィトバクテリウム フラビエリ (*Desulfitobacterium frappieri*)

C: アクチノマイセタレス Sm-1 (ロドコッカス sp. Sm-1) (*Actinomycetales* Sm-1 (*Rhodococcus* sp. Sm-1))

D: ロドコッカス ロドコッカス (*Rhodococcus rhodococcus*)

E: キサントバクター フラバス (*Xanthobacter flavus*)

F: マイコバクテリウム L1 (*Mycobacterium* L1)

G: デスルフォミクロビウム ノルベギカム (デスルフォヴィブリオ バキュラタス) (



Desulfomicrobium norvegicum (Desulfovibrio baculatus))H: デスルフィトバクテリウム デハロゲナンス (Desulfitobacterium dehalogenans)I: デスルフィトバクテリウム ハフニエンス (Desulfitobacterium hafniense)J: クロストリジウム フォルミコアセチカム (Clostridium formicoaceticum)K: デスルフロノナス クロロエテニカ (Desulfuromonas chloroethenica)L: アセトバクテリウム ウッディ DSM 1030 (Acetobacterium woodii DSM 1030)M: デハロバクター レストリクタス (Dehalobacter restrictus)N: デスルフィトバクテリウム sp. PCE1 (Desulfitobacterium sp. strain PCE1)O: デスルフィトバクテリウム フラピエリ TCE1 (Desulfitobacterium frappieri TC E1)P: アセトバクテリウム ウッディ DSM 2396 (Acetobacterium woodii DSM 2396)Q: デスルフォモニル タイドジェイ DCB-1 (Desulfomonile tiedjei DCB-1)

## 【0014】

具体的には、本発明のDNAプローブの一態様は、前記Aのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号1および配列番号19から25のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。ここで、配列番号1に由来する本発明のポリヌクレオチドとは、前記(1)の配列番号が配列番号1である前記(1)から(4)のいずれかのポリヌクレオチドを意味する。

## 【0015】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Bのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号2および配列番号26から30のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

## 【0016】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Cのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号3および配列番号31から35のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

## 【0017】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Dのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号4および配列番号36から40のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

## 【0018】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Eのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号5および配列番号41から45のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

## 【0019】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Fのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号6および配列番号46から48のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

## 【0020】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Gのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号7および配列番号49から53のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

## 【0021】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Hのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号8および配列番号54から57のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

## 【0022】

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Iのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号9および配列番号58から62のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

**【0023】**

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Jのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号10および配列番号63から68のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

**【0024】**

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Kのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号11および配列番号69から74のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

**【0025】**

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Lのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号12および配列番号75から79のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

**【0026】**

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Mのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号13および配列番号80から86のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

**【0027】**

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Nのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号14および配列番号87から91のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

**【0028】**

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Oのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号15および配列番号92から96のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

**【0029】**

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Pのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号16および配列番号97から99のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

**【0030】**

その他の態様として、本発明のDNAプローブは、前記Qのバクテリアを検出するためのDNAプローブであって、配列番号17および配列番号100から105のいずれかに由来する本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。

**【0031】**

本発明のDNAマイクロアレイは、本発明のDNAプローブが少なくとも1つ基板上に固定されたDNAマイクロアレイである。本発明のDNAマイクロアレイは、少なくとも2つ以上の本発明のDNAプローブが固定され、前記AからQのバクテリアの少なくとも2種以上を同時に検出できることが好ましい。

**【0032】**

本発明のバクテリアの検出キットは、前記AからQのバクテリアの少なくとも1種を検出するためのキットであって、少なくとも1つの本発明のDNAプローブと、前記DNAプローブにハイブリダイズすることで検出されるターゲットを調製するための遺伝子増幅用プライマーおよび遺伝子増幅用試薬とを含むバクテリアの検出キットである。

**【0033】**

本発明のバクテリアの検出キットは、その他の態様として、前記AからQのバクテリアの少なくとも1種を検出するためのキットであって、本発明のDNAマイクロアレイと、前記DNAマイクロアレイにハイブリダイズすることで検出されるターゲットを調製するための遺伝子増幅用プライマーおよび遺伝子増幅用試薬とを含むバクテリアの検出キットである。

**【0034】**

本発明のバクテリアの検出方法は、検出対象試料から調製した核酸から遺伝子増幅方法

によりターゲットを調製し、前記ターゲットと本発明のDNAプローブに少なくとも1つとをハイブリダイズさせることにより前記試料中のバクテリアを検出する方法である。

#### 【0035】

本発明のバクテリアの検出方法は、その他の態様として、検出対象試料から調製した核酸から遺伝子増幅方法によりターゲットを調製し、前記ターゲットと本発明のDNAマイクロアレイとをハイブリダイズさせることにより前記試料中のバクテリアを検出する方法である。

#### 【0036】

まず、本発明のポリヌクレオチドの一つを構成する配列番号1から17の塩基配列について説明する。配列番号1から17の塩基配列は、それぞれ、嫌気性PCE分解関連バクテリアである前記AからQのバクテリアのITS配列に相当する配列である。前記ITS配列は、原核生物の16S-23S ITS配列を意味する。原核生物のリボゾーマルRNA (rRNA) である16SrRNA、23SrRNAおよび5SrRNAは、通常、一つの転写単位 (オペロン) として転写されるため、16SrRNA遺伝子と23SrRNA遺伝子は隣り合ってゲノム上に配置されている。この16SrRNA遺伝子と23SrRNA遺伝子との間の領域が、16S-23S Internal Transcribed Spacer (ITS) と呼ばれる領域である。本発明者らは、前記AからQのバクテリアにおける前記ITSの配列を初めて決定し、このITS配列であれば、前記AからQのバクテリアのそれぞれに特有のDNAプローブが作製できることを初めて見出したのである。

#### 【0037】

したがって、本発明のポリヌクレオチドとしては、下記(1)から(4)のいずれかのポリヌクレオチドがあげられる。

(1) 配列番号1から17のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

(2) 前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(3) 前記(1)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(1)のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

(4) 前記(1)から(3)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

#### 【0038】

また、本発明者らは、前記ITS配列 (配列番号1から17) の一部も、前記バクテリアAからQのDNAプローブとして使用できることも見出した。したがって、本発明のポリヌクレオチドは、前記(1)から(4)のポリヌクレオチドの一部であるポリヌクレオチドであってもよく、例えば、下記(5)から(8)のいずれかのポリヌクレオチドであってもよい。

(5) 配列番号19から105のいずれかの塩基配列からなるポリヌクレオチド。

(6) 前記(5)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(5)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(7) 前記(5)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(5)のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

(8) 前記(5)から(7)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

#### 【0039】

ここで、欠失、置換もしくは付加が可能な塩基数としては、例えば、40塩基に対して

、欠失・付加で、1個～6個であり、1個～3個が好ましく、より好ましくは1個～2個であり、置換で、1個～4個であり、1個～2個が好ましく、より好ましくは1個である。ハイブリダイズする前記ストリンジェントな条件としては、例えば、配列番号で示された塩基配列の $T_m$ 値の $\pm 10^\circ\text{C}$ があげられる。また、前記相同性としては、例えば、90%以上であり、95%以上が好ましく、より好ましくは、97.5%以上である。

#### 【0040】

次に、本発明のDNAプローブについて説明する。本発明のDNAプローブは、前記AからQのバクテリアのいずれかを検出できるDNAプローブであって、本発明のポリヌクレオチドからなるDNAプローブである。本発明のDNAプローブとしては、前記バクテリアAからQのITS配列全体（配列番号1から17）よりもその一部の塩基配列に由来するものが好ましい。DNAプローブは、通常、その長さが短くなるほど配列特異性が増するものが好ましい。DNAプローブは、信頼度が向上するからである。一方、配列自体が前記バクテリアそれぞれに対して特有である必要がある。したがって、DNAプローブの長さとしては、特に制限されないが、例えば、10塩基から前記ITS配列全体であり、40～80塩基が好ましい。

#### 【0041】

前記バクテリアAからQのITS配列全体（配列番号1から17）の一部である40塩基の塩基配列の具体例が、配列番号19から105の塩基配列であって、配列番号19から25が配列番号1の一部に該当し、配列番号26から30が配列番号2の一部に該当し、配列番号31から35が配列番号3の一部に該当し、配列番号36から40が配列番号4の一部に該当し、配列番号41から45が配列番号5の一部に該当し、配列番号46から48が配列番号6の一部に該当し、配列番号49から53が配列番号7の一部に該当し、配列番号54から57が配列番号8の一部に該当し、配列番号58から62が配列番号9の一部に該当し、配列番号63から68が配列番号10の一部に該当し、配列番号69から74が配列番号11の一部に該当し、配列番号75から79が配列番号12の一部に該当し、配列番号80から86が配列番号13の一部に該当し、配列番号87から91の配列番号14の一部に該当し、配列番号92から96が配列番号15の一部に該当し、配列番号97から99が配列番号16の一部に該当し、配列番号100から105が配列番号17の一部に該当する。

#### 【0042】

現在、PCEの分解に関連する嫌気性バクテリアとして報告されている嫌気性バクテリアは18種であり、前記AからQの17種のバクテリアと下記Rのバクテリアである。なお、前記AからQのバクテリアは、以下に示す生物資源保存機関ATCCまたはDSMZの寄託番号が付されている。

R: Dehalococcoides ethenogenes 195

A: DSM 12446	B: DSM 13498	C: ATCC 51239	D: ATCC 21197	E: DSM 10330
F: DSM 6695	G: DSM 1741	H: DSM 9161	I: DSM 10644	J: ATCC 27076
K: DSM 12431	L: DSM 1030	M: DSM 9455	N: DSM 10344	O: DSM 12704
P: DSM 2396	Q: ATCC 49306			

前記バクテリアRのゲノム配列は、コーネル大のDr. Zinder氏により配列決定されたものであるが、本発明者らは、前記バクテリアRのITS配列（配列番号18）およびその一部からなるポリヌクレオチドのDNAプローブが前記バクテリアRに特異的であり、本発明のDNAプローブと併用すれば、前記18種のバクテリアの全てを検出できるDNAプローブとすることができることを、初めて見出したのである。

#### 【0043】

前記バクテリアR用のDNAプローブとしては、下記（9）から（12）のいずれかのポリヌクレオチドからなるDNAプローブがあげられる。

（9）前記バクテリアRのITS配列である配列番号18の塩基配列またはその一部である配列番号106から115のいずれかの40塩基の塩基配列からなるポリヌクレオチド

。

（10）前記（9）のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換

もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(9)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(11) 前記(9)のポリヌクレオチドの塩基配列の1個から数個の塩基が、欠失、置換もしくは付加された塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、前記(9)のポリヌクレオチドとの相同性が90%以上であるポリヌクレオチド。

(12) 前記(9)から(11)のいずれかのポリヌクレオチドと相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド。

#### 【0044】

次に、本発明のDNAマイクロアレイについて説明する。本発明のDNAマイクロアレイは、本発明のDNAプローブが少なくとも一つ基板上に固定されたものであり、好ましくは、2種類以上の本発明のDNAプローブが固定され、2種以上の前記バクテリアが検出できるDNAマイクロアレイであって、より好ましくは、前記バクテリアAからRのそれぞれに対応するDNAプローブが固定されたDNAマイクロアレイである。前記18種に対応する本発明のDNAプローブが固定されたDNAマイクロアレイであれば、一度に18種類の前記バクテリアの検出ができる。本発明のDNAマイクロアレイに固定するDNAプローブは、ノイズを抑えるため長さが短いほうが好ましく、また、 $T_m$ 値を一定にすることでクロスハイブリを抑制するためにそれぞれの長さをそろえることが好ましい。前記バクテリアAからQを検出するための本発明のDNAプローブとしては、例えば、配列番号19から105の塩基配列に由来するDNAプローブを使用でき、前記バクテリアRを検出するためのDNAプローブとしては、例えば、配列番号106から115の塩基配列に由来するDNAプローブが使用できる。前記基板としては、特に制限されず、市販のDNAマイクロアレイ用基板等が使用でき、前記基板上へのDNAプローブの固定方法は、特に制限されず、従来公知の方法を適用できる。

#### 【0045】

次に、本発明のバクテリアの検出キットは、前記AからRのバクテリアを検出するためのキットであって、少なくとも1つの本発明のDNAプローブと、前記DNAプローブにハイブリダイズすることで検出されるターゲットを調製するための遺伝子増幅用プライマーおよび遺伝子増幅用試薬とを含むバクテリアの検出キットである。

#### 【0046】

本発明の検出キットを用いれば、例えば、バクテリアを検出する試料から核酸を抽出し、前記核酸を前記遺伝子増幅用プライマーと前記遺伝子増幅用試薬を用いて遺伝子増幅を行いターゲットを調製し、前記ターゲットを本発明のDNAプローブとハイブリダイゼーションすることで、簡単かつ迅速に、前記試料中の前記AからRのバクテリアを検出できる。前記核酸は、例えば、DNAでもよく、RNAでもよい。本発明のキットは、必要に応じて、核酸抽出用試薬およびフィルターもしくはチップ等を含んでいてもよい。前記ターゲットは、試料中のバクテリアの配列であって、前記DNAプローブの配列の相補配列であり、検出方法に応じた標識をされた前記ターゲットと前記DNAプローブとがハイブリダイズすることで検出可能となる。前記ターゲットの標識方法は、特に制限されず、例えば、前記遺伝子増幅用プライマーに予め標識しておく方法等があげられる。

#### 【0047】

前記遺伝子増幅の方法は、本発明のDNAプローブであるITSを含む領域を増幅できるものであれば、特に制限されず、従来公知の遺伝子増幅方法を使用できる。前記遺伝子増幅方法として、例えば、PCR法を用いる場合、前記遺伝子増幅用プライマーとしては、例えば、センスプライマーとして配列番号116の塩基配列からなるプライマーを使用でき、アンチセンスプライマーとして、前記バクテリアR以外には、配列番号117の塩基配列からなるプライマーを使用でき、前記バクテリアRには、配列番号118の塩基配列からなるプライマーを使用できる。また、前記遺伝子増幅用試薬としては、従来公知の試薬が利用でき、例えば、バッファー、ポリメラーゼ、ヌクレオチド等があげられる。

#### 【0048】

前記ターゲットと本発明のDNAプローブとをハイブリダイズさせる方法は、特に制限されず、例えば、サザンブロット、DNAアレイ、DNAマイクロアレイ、DNAチップ等、従来公知の遺伝子検出技術を利用できる。これらのなかでも、本発明のマイクロアレイを使用することが好ましく、前記18種のバクテリアが検出可能な本発明のマイクロアレイを使用することがより好ましい。したがって、本発明のキットの好ましい態様としては、本発明のDNAマイクロアレイと、前記DNAマイクロアレイにハイブリダイズすることで検出されるターゲットを調製するための遺伝子増幅用プライマーおよび遺伝子増幅用試薬とを含むバクテリアの検出キットである。

#### 【0049】

次に、本発明のバクテリアの検出方法は、検出対象試料から調製した核酸から遺伝子増幅方法によりターゲットを調製し、前記ターゲットと本発明のDNAプローブとをハイブリダイズさせることにより前記試料中から前記AからRのバクテリアを検出する方法である。ハイブリダイズの方法は、特に制限されず、例えば、サザンブロット、DNAアレイ、DNAマイクロアレイ、DNAチップ等、従来公知の遺伝子検出技術を利用できる。これらのなかでも、前記AからRの全てのバクテリアを検出できる本発明のDNAマイクロアレイを使用する方法が好ましい。本発明の検出方法は、例えば、前述した本発明のキットを用いて行うことができる。

#### 【0050】

一般に、PCEは、例えば、図3Aに示すとおり、PCEから、TCE、ジクロロエチレン(DCE)、ビニルクロライド(VC)と、この順で脱塩素化され、前記VCは、エテンまたは二酸化炭素に分解される。前記AからRのバクテリアのPCEおよびその脱塩素化物に対する分解活性を、図3Bに示す。図3Bに示すとおり、前記AからRのバクテリアのPCEおよびその脱塩素化物に対する分解活性は様々である。例えば、前記バクテリアRは、PCEを、エテンまで一つずつ脱塩素化していくが、前記バクテリアM、AおよびGは、PCEを、シス型のDCEに分解する。

#### 【0051】

したがって、本発明のポリヌクレオチドを用いて、PCEやTCEで汚染された環境中の前記AからRのバクテリアを検出すれば、検出された前記バクテリアのPCEおよびその脱塩素化物に対する脱塩化能力に基づき、前記環境のPCEまたはTCEの除去能力を判定することが可能となる。前記環境としては、特に制限されず、例えば、汚染された土壌、地下水、池、海水等があげられる。

#### 【0052】

バイオレメディエーションを適用するにあたり、前述のように本発明のポリヌクレオチドを用いて汚染環境のPCEおよびその脱塩素化物の除去能力を判定できれば、例えば、バイオスティミュレーションが可能か、または、バイオオーギュメンテーションが必要かの判定が容易となる。例えば、バクテリアRが検出されれば、前記バクテリアRでPCEをエテンにできるから、前記バクテリアRの増殖や活性を高める栄養素を環境に導入するバイオスティミュレーションを選択できる。また、例えば、バクテリアKとCとが検出された場合も、前記2種のバクテリアでPCEを二酸化炭素に分解できるから、バイオスティミュレーションが選択できる。

#### 【0053】

さらに、PCEの分解は、好気性条件では困難であると考えられており、また、通常、地表より50cm以下は嫌気性であると考えられるから、例えば、PCE汚染環境や地表50cm以下の汚染環境を、本来利用可能な嫌気性バクテリアではなく好気性バクテリアで修復することは、余分なコストの投入となる場合があるが、本発明のポリヌクレオチドによれば、前記嫌気性バクテリアを容易かつ迅速に検出できるから、例えば、PCE汚染環境や、地表50cm以下の汚染環境を修復する際に、好気性バクテリアを利用することによる余分なエネルギーの使用を回避することが可能となる。

#### 【0054】

以下に、本発明の実施例について説明する。

## 【実施例 1】

## 【0055】

(DNAプローブの作製)

前記バクテリアAからRのITS配列(配列番号1から18)から、40塩基からなる配列をデザインし、DNAマイクロアレイのDNAプローブとした。前記DNAプローブのデザインは、40塩基、GC含有量48-50%の一本鎖であり、相補性がないかまたはほとんどなく、国際データベースGenBankでヒットがない(あっても2以上のミスペア)ことを基準として行った。その結果、前記各バクテリアについてそれぞれ3から10のDNAプローブを作製した(配列番号19から115)。

## 【0056】

バクテリアAのプローブA1からA7が、それぞれ、配列番号19から25の塩基配列であり、バクテリアBのプローブB1からB5が、それぞれ、配列番号26から30の塩基配列であり、バクテリアCのプローブC1からC5が、それぞれ、配列番号31から35の塩基配列であり、バクテリアDのプローブD1からD5が、それぞれ、配列番号36から40の塩基配列であり、バクテリアEのプローブE1からE5が、それぞれ、配列番号41から45の塩基配列であり、バクテリアFのプローブF1からF3が、それぞれ、配列番号46から48の塩基配列であり、バクテリアGのプローブG1からG5が、それぞれ、配列番号49から53の塩基配列であり、バクテリアHのプローブH1からH4が、それぞれ、配列番号54から57の塩基配列であり、バクテリアIのプローブI1からI5が、それぞれ、配列番号58から62の塩基配列であり、バクテリアJのプローブJ1からJ6が、それぞれ、配列番号63から68の塩基配列であり、バクテリアKのプローブK1からK6が、それぞれ、配列番号69から74の塩基配列であり、バクテリアLのプローブL1からL5が、それぞれ、配列番号75から79の塩基配列であり、バクテリアMのプローブM1からM7が、それぞれ、配列番号80から86の塩基配列であり、バクテリアNのプローブN1からN5が、それぞれ、配列番号87から91の塩基配列であり、バクテリアOのプローブO1からO5が、それぞれ、配列番号92から96の塩基配列であり、バクテリアPのプローブP1からP3が、それぞれ、配列番号97から99の塩基配列であり、バクテリアQのプローブQ1からQ6が、それぞれ、配列番号100から105の塩基配列であり、バクテリアRのプローブR1からR10が、それぞれ、配列番号106から115の塩基配列である。

## 【0057】

(DNAマイクロアレイの作製とDNAプローブの特異性の確認)

次に、前記97種類のDNAプローブを、Affymetrix 417 Arrayerにより、Takara Hybrid Slideにカスタムプリントし、DNAマイクロアレイを作製した。そして、ターゲットを前記AからRのバクテリアからそれぞれ調製し、そのターゲットを前記DNAマイクロアレイとハイブリダイズすることで、DNAプローブの特異性を確認した。

## 【0058】

前記ターゲットは、前記バクテリアのITS領域をPCR法で増幅して調製した。前記PCRにおいて、センスプライマーとして配列番号116の塩基配列からなる非標識プライマーを使用し、アンチセンスプライマーとして前記バクテリアR以外には配列番号117の塩基配列からなるCy3標識プライマーを使用し、前記バクテリアRには配列番号118の塩基配列からなるCy3標識プライマーを使用した。PCRの反応条件は、標準的なプロトコールに従った。

## 【0059】

ターゲットとなる前記PCRの増幅産物を、Autoseq G-50(ファルマシア社製)を用いて脱塩し、SpeedVac(Savant社製)を用いて吸引乾燥し、最終濃度が $5 \times \text{SSC}$ 、0.2% SDS、50%ホルムアミドであるバッファーに溶解させた。前記ターゲット溶解液を、94℃で3分間ボイルして少なくとも2分間氷冷した後、前記DNAマイクロアレイ上にアプライした。その後、カバーガラスを前記DNAマイクロアレイ上にかぶせ、そのように準備したものを42℃で設定されたハイブリダイゼーションチャンバー内に少なく



とも4時間配置した。その後、前記DNAマイクロアレイを、 $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $0.2\% \text{ SDS}$ で5分間、 $0.2 \times \text{SSC}$ で5分間、そして、 $0.05 \times \text{SSC}$ で数秒間洗浄し、 $1,800 \text{ rpm}$ でスピンドライし、Scanarray version 5 (パーキンエルマージャパン社製) でスキャンした。

#### 【0060】

その結果をまとめたものを図1に示す。図1は、縦軸に示された18のバクテリアのITS配列のターゲットと、横軸に示す97のDNAプローブとハイブリダイズしたかどうかを示すグラフであり、黒塗りの部分が、500蛍光ユニット以上のシグナルを示してDNAプローブとターゲットとがハイブリダイズしたことを示す。なお、横軸の系統樹は、ITS配列のアライメントから作製したものである。図1に示すとおり、前記AからRのバクテリアそれぞれから調製したターゲットは、クロスハイブリダイズすることなく、前記AからRのバクテリアのDNAプローブのみと有意にハイブリダイズすることが示された。

#### 【実施例2】

##### 【0061】

T.H. Lee博士(韓国)の提供による嫌気的集積培養試料を用いて、下記96種類のDNAプローブを配置したDNAマイクロアレイを用いて検出した。まず、前記嫌気性集積培養試料からFastPrep bead-beater and soil DNA extraction kit (Q Bionene社製)を用い、取扱い説明書に従って、DNAを抽出した。前記DNAから、実施例1と同様のプライマーを用いてPCR法によりターゲットを調製し、実施例1と同様の条件で前記DNAマイクロアレイとハイブリダイズした。

##### 【0062】

その結果、バクテリアA、J、M、NおよびOの一部のプローブに強いシグナルが検出され、バクテリアBおよびIのプローブからも弱いシグナルが検出された。その結果を図2に示す。図2および図3Bから前記試料には、PCEをcisDCEに変換するバクテリアが存在することが示されるが、これは、T.H. Lee博士による前記集積培養のPCE/cisDCEの分析データと一致する内容であった。

#### 【産業上の利用可能性】

##### 【0063】

以上、説明したとおり、本発明のポリヌクレオチドは、PCE分解関連バクテリアの検出に有用であり、例えば、汚染環境の修復方法、とりわけ、バイオレメディエーションの分野で有用である。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0064】

【図1】図1は、本発明の一例におけるDNAマイクロアレイによる検出結果を示す図である。

【図2】図2は、本発明のその他の例におけるDNAマイクロアレイによる検出結果を示す図である。

【図3】図3は、本発明に関わる嫌気性PCE分解関連バクテリアの分解活性を説明する図である。

#### 【配列表フリーテキスト】

##### 【0065】

配列番号116	PCR用センスプライマー27F
配列番号117	PCR用アンチセンスプライマー132R
配列番号118	PCR用アンチセンスプライマー341R



## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Gifu University  
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology  
Matsushita Environmental & Air-conditioning Engineering Co.,Ltd.

<120> ITS sequence of PCE degrading bacteria

<130> 8009150035

<160> 118

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 742

<212> DNA

<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 1  
aagtcgtaac aaggtaacg taggagaacc tgcggttgga tcacctcctt tctagagtat 60  
aggggcacta tctcacaatg gtgctccggc gagcatagct aggggaagctt atttagtttt 120  
gagagattga atgaaaaagg ggcttatagc tcaggtgggt agagcgtacc cctgataagg 180  
gtaaggtcag aggttcgagt cctcttaagc ccaccatggg gaattagctc agctgggaga 240  
gcgccctgctt tgcacgcagg aggtcagcgg ttcgatcccg ctattctcca ccatttttta 300  
gagaaatggg gaaagattgc caagagacat tgtagtgag aatgaagaca caatgtctaa 360  
tataagaaca atttaggttg tttttatatt agacttttta gtctaagttt atgttctaca 420  
atttagaata cgacgctttg tgttgtgctg taggtttggg tctttaagat agctttgcta 480  
tctggtgaaa gaacataaag atgttattta atttattatt gtcaaagtca acaaaacgca 540  
aaaaaaacaa tttacaactt gtagatggt ttacatttaa taaggagtg aaatgtgcat 600  
tagaatacaa ataggtaagc tattaagagc gaatggtgga tgcctaggct gtaagaggcg 660  
atgaaggacg tactagactg cgataagtta cggggagctg tcaagaagct ttgatccgta 720  
aatttccgaa tggggcaacc ca 742

<210> 2

<211> 527

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Desulfitobacterium frappieri

&lt;400&gt; 2

```

aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggaga      60
catgttcact ctggaagtga gcatatccta aggtcgatgc tttgaaggac gtcacggaag      120
agatgaagtg aaacggttca aagctggaga agtctgaaga gacttcgaaa tgccgaagag      180
gcaaagcagg ggaaatctgc ataagatgac cctgaaatcg agtcaaacct gttcaagcgc      240
aagcttactt gttgtttagt tttgaggggac cagcaatgga aactcattat ttttttgacc      300
aaaagtcaag aaaaactggt ctttgaaaac tgcacagaga agaaaaaact gtaatttagg      360
ataacatctg aaaaacctga atgtggcgga gacgtttggt caagctacta agggcgtagc      420
gtggatgcct aggcgctaag agtcgaagaa ggacgcggcg agcggcgaaa cgccacgggg      480
agcagtaagc atgctttgat ccgtggatat ccgaatgggg caaccca                        527

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 478

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Actinomycetales Sm-1

&lt;400&gt; 3

```

aagtcgtaac aaggtagccg taccggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggagc      60
aactcccgtc ggtgggtcac acaggtgact ccgccacggg cagagccatt tcggattcac      120
acgtaatccg gtggtgctca tgggtggaac gctgacagct acttctcgtc cgggtcccgt      180
ttctgtgcgg gatccgagga gttatatcgg tgcactgttg ggtcctgaga gaacacgcga      240
gtgttttgtc agcgacgatg atccgcgaaa caagaggaca tggttttctt gcggtagggg      300
ttgtttgttg ttgtttgaga actgcacagt ggacgcgagc atctttgttg taagtgttta      360
tgagcgtacg gtggatgcct tggcaccagg agccgatgaa ggacgtggga ggctgcgata      420
tgcctcgggg agctgtcaac cgagctgtga tccgaggatt tccgaatggg gcaaccca      478

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 478

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rhodococcus rhodococcus

<400> 4  
aagtcgtaac aaggtagccg taccggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggagc 60  
aactccttgc tcggaccagc acacaggtgc cgggggagcg aggcagagcc atttcggatt 120  
cacacgtaat ccggtggtgc tcatgggtgg aacgctgaca gtcacaccg cgcggaagg 180  
acccgagtgt ctttctgcgg tggttataat ggtgcactgt tgggtcctga gagaacacgc 240  
gagtgttttg tcagcgacga tgatcgggaa cgaaggggtt gtttcttctt ccggtaccgg 300  
ttgttgtgtg ttgtttgaga actgcacagt ggacgcgagc atctttgttg taagtgttta 360  
tgagcgtacg gtggatgcct tggcaccagg agccgatgaa ggacgtggga ggctgcgata 420  
tgcctcgggg agctgtcaac cgagctgtga tccgaggatt tccgaatggg gaaaccca 478

<210> 5  
<211> 952  
<212> DNA  
<213> Xanthobacter flavus

<400> 5  
aagtcgtaac aaggtagccg taggggaacc tgcggctgga tcacctcctt tctaaggagc 60  
atccctcagt attgagactt cggctctgat ctatcggatc tcttcagaaa catcagccgg 120  
acataggtgg aaacatcatg atctggcatt ggccggacac cgccgtcttc gtttctcttt 180  
cttcgcggac aagcttgacg cccaggttgc ggtccttttg actgcgttcc ggtttcgggc 240  
ctgtagctca ggtgggttaga gcgcaccctt gataagggtg aggtcggacg ttcgagtcgt 300  
cccaggccca ccaccatcag acagtcttg cctgcgcctc atgtccgaag cttcgcgaac 360  
tctcgcctgt ggcatcctgt gatggggcca tagctcagtt gggagagcgc gtgctttgca 420  
agcatgaggt cgtcggttcg atcccgtctg gctccaccat tcttcttttc ttgaggaaga 480  
tgatggcagg gtggtttgcg ctcggctcct ttgagtgaag gctcttgggg tcttgagcgt 540  
cttgtccgcg aatatctgtt tcgcatgttc catcatgccg gtctccggcg gaacatgcac 600  
ggctgtatga catcgtgaat agggcattga tcgactgtac cgtggcaaca cggtcgggtc 660  
gtggggaagg tggcgacacc ttctgatgcg atcattgggt gctgaccgca ccattgtcga 720  
caatgcgaag ctggtctttt caaagaagac gtcgaagccg tccggccggg agcaatcctg 780

gtgcgggcct ctgccgaggg gtgggcatcg acgatgagaa cgatcaagtg tcttaagggc 840  
attcgggtgga tgccttggcg ctaagaggcg aagaaggacg tgatacgctg cgataagctt 900  
cggggagccg cgaatgggct ttgatccgga gatttccgaa tggggcaacc ca 952

<210> 6  
<211> 579  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium L1

<400> 6  
aagtcgtaac aaggtagccg taccgaaggt gcggctggat cacctccttt ctaaggagca 60  
ccacgagacc tggccggccc gtaaatcgcg ggatcagccg attgtcaggc gattcgttgg 120  
atggcccttt cacctgtagt ggggtgggggt ctgggtgcacg acaagcaaac gaccaggatg 180  
gggaccttcc ttgtgggggt tgtctgggtc tgccaaacac actgttgggc tttgagacaa 240  
caggcccgtg cccgggtttc cgggtggctc cgcggtgggtg gggtcggcgt gttgttgcct 300  
cactttgggtg gtgggggtgtg gtgtttgatt tgtggatagt ggttgcgagc atctagcacg 360  
caaagtggc tctcagggtt ttcgggtctg ggggggtgtgt ttgtgtgctt ttgatgtgca 420  
gtttcttttt tcgaattggg tttttgtgtt gtaagtgttt aagggcgcat ggtggatgcc 480  
ttggcactgg gagccgatga aggacgtggg aggctgcgtt atgcctcggg gagctgtcaa 540  
ccgagcgtgg atccgaggat gtccgaatgg ggcaaccca 579

<210> 7  
<211> 523  
<212> DNA  
<213> Desulfomicrobium norvegicum

<400> 7  
aagtcgtaac aaggtagccg taggggaacc tgcggctgga tcacctcctt atcaagaatt 60  
ctccaactcg ctatttactt gcaaggtttc ttaccttgtc ggttttagaaa tgggcttgta 120  
gctcaggtgg ttagagcgca cgcctgataa gcgtgaggtc ggaagttcaa gtcttcccag 180  
gcccaccatt tcttagtggg ggtgtagctc agctgggaga ggcctgcct tgcacgcagg 240  
aggatcatcag ttcgatcctg ttacacctca ccattttcca actcgacaag aatttatgtt 300

gctagtcctt atcgctcagag tgtcttttga cactatggcg cccaagcata gcagcttgtg 360  
atcattgaca gacgaatagg tgaagagaag agagttaaga tgttaagggc atacggtgga 420  
tgccttggcg tcaggaggcg atgaaggacg tggaaggctg cgataagcct cggggagccg 480  
tcaagcaggc tttgatccgg ggatttccga atggggcaac cca 523

<210> 8  
<211> 662  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium dehalogenans

<400> 8  
aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggaga 60  
catggtttct cgctagagaa atcatatcct aaggtcgatg ctttgaagaa cgtcacggaa 120  
gcaatgaagt gaaacgattc aaagtcggag aagtcttaag agacttctta taggaaactt 180  
ggcttgtgtg aagcatgagc agaagccata gttgacttat ccacggagtg gaaaaatgcc 240  
gaagaggcaa aacggagcaa tccgtaaagt atgggaaatg aagctgttga agttaaagc 300  
taacttgttg tttagtittg agggaccata aagtcttcta tatgggggta tagctcagct 360  
gggagagcac ctgccttgca agcaggggggt cagcggttcg atcccgtta cctccaccat 420  
aatatatctg gtttctctaa tgtttattat gttctttgaa aactgcacag agaagaagaa 480  
aactgtaatt aggataacat ctaaaacct gaagtggcgg caaaaaacgt ttggtcaagc 540  
tactaagggc gtacggtgga tgcctaggcg ctaagagtcg aagaaggacg cggcgagcgg 600  
cgaaacgcca cggggagcag taagcatgcc ttgatccgtg gatatccgaa tggggcaacc 660  
ca 662

<210> 9  
<211> 775  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 9  
aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggagc 60  
catgttcact ctggaagtga gcataatccta aggtcgatgc tttgaaggac gtcacggaag 120

agatgaagtg aaacggttca aagctggaga agtctataga gacttcgaag tgccgaagag 180  
 gcaaagcagg ggaaatctgc ataagatgac cctgaagtcg agtcaaacct gttcaagcgc 240  
 aagcttactt gttgtttagt tttagagagac cataaagtct tctatgggct tatagctcag 300  
 ctggttagag cgcacgcctg ataagcgtga ggtcgggtgg tgcagtcac ctaggccac 360  
 cattattcaa agaggataga gacccgaacc tccaaacaat acttcacgcc agaacatacc 420  
 taacaggggt gagtattgag aggggagcgg ctccctctc aacgacatgg gggatatagct 480  
 cagctggggg agcacctgcc ttgcaagcag ggggtcagcg gttcgatccc gcttacctcc 540  
 accatcatat actggtttct ctaatgttct ttgaaaactg cacagagaag aaaaaactgt 600  
 aatttaggat aacatctgaa aaacctgaat gtggcggaga cggtttgtca agctactaag 660  
 ggcgtacggt ggatgcctag gcgctaagag tcgaagaagg acgcggcgag cggcgaaacg 720  
 ccacggggag cagtaagcat gccttgatcc gtggatatcc gaatggggca accca 775

<210> 10  
 <211> 422  
 <212> DNA  
 <213> Clostridium formicoaceticum

<400> 10  
 aagtcgtaac aaggtagccg tatcgggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggaga 60  
 aaggctttta ctatactgtt taattttgag ggacttttgt ttctcaataa gcagacaacc 120  
 aaaatcctag attttgtgtt agtcgcttag ttaaaaattc tgtaattcac gacaatagtt 180  
 ttaaaccaac aaaaaatgaa tggaagaatt ttaacatct atagtctttt agattgttct 240  
 ttgaaaacta aacaatgata tgagaaaaga aaagctgaag taattcacta aaggtcaagt 300  
 tattaagggc aaagggtgga tgccttggca ctaggagccg aagaaggacg tggttaagctg 360  
 cgaaaagcca cggggagctg caagcaagta ttgatccgtg gatgtccgaa tggggaaacc 420  
 ca 422

<210> 11  
 <211> 699  
 <212> DNA

## &lt;213&gt; Desulfuromonas chloroethenica

&lt;400&gt; 11

aagtcgtaac aaggtagccg taggggaacc tgcggcctgg atcacctcct ttctaaggag 60  
cctccttact cgtaagagta aaggcatcct ggtcaatccc tcggcatggt ccgagcggat 120  
gcccgcaaag catcattgtc tgctatttag ttttgagaga ccagaacctc gcaagagggtt 180  
ttttgttctt tgagacaaga cgaacgaagg tggaagtggg ctagtagctc agctggctag 240  
agcacacgac tgataatcgt gaggtcggag gttcgagtc tccctggccc accagattat 300  
ttgggggtgt agctcagttg ggagagcgcc tgccttgac gcaggaggtc atcggttcga 360  
tcccgttcac ctccaccaga tgttctgtca ggagtaagga gagaagagtg aggagtacac 420  
ctcacctaata cgccttacgc ctaccgatt ttcttgttct ttggcaattg cataagactg 480  
atacgatgca cgaagtaaag cgttgcgtac gcaagtacgt gacacgcgaa ggtagcaaca 540  
cgatcgctta agtagaagac ttttttatgg tcaagctatt aagggcgtac ggtggatgcc 600  
ttggcatcgg gaggcgatga aggacgtggt aagctgcgaa aagcttcggt aagccgctaa 660  
acaggctttg acccgagat gtccgaatgg ggaaaccca 699

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 391

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Acetobacterium woodii

&lt;400&gt; 12

aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaggaat 60  
acaggaagtc atggtactat tttcttttgt atgaccatct ggttatgcaa aaacagttaa 120  
agaaggcatc ttaggatgca ttttttaacg ggacaaatac cggagtagtg gtagcaggtc 180  
ccaatcgatc attgaaaaca gcatagtgtg taaataaaat tataaaatac aatttcttaa 240  
cacgaaaacg taaattatta ggatcaagaa gaaaagagca cagggtgaat gccttggcaa 300  
tcagagccga cgaaggacgc gacaagctgc gaaaagctac gtgtaggtgc acataaccgt 360  
taaagcgtag atatccgaat ggggcaaccc a 391

&lt;210&gt; 13

<211> 608  
 <212> DNA  
 <213> Dehalobacter restrictus

<400> 13  
 aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggaga 60  
 accgattgaa gctagacttc aatctactcc aaggtcggta cttagagtaa agcagtgcaa 120  
 actggactga ctctcaagta aggtgagttt agcaatttat ttcttgttgt ttagttttga 180  
 gtgacctgag cacagtaatg tgtaaaagaa acactcaaata aatgtccata catatcagag 240  
 attctggtaa gtatggaaaa acatccttgt tctttgaaaa ctgcacaacg agaaaagcag 300  
 aatgcgaaat gcgaaagtaa agacaacgaa atggcggtta aattctaaag cgcaaaaact 360  
 taacgttttc gcgcgtggca aatttgaact taggagcatc tatgctccgt caggtaagaa 420  
 ttactaagcg cataggagac attcaaatca tctataacaa gtcgaggaag aaccagaagg 480  
 tcaagatata aagggcatac ggtggatgcc ttggcgccaa gagccgaaga aggacgcggt 540  
 taacagcgaa atgccacggg gagtcgtaag caggcataga tccgtggatg tccgaatggg 600  
 gaaaccca 608

<210> 14  
 <211> 689  
 <212> DNA  
 <213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 14  
 aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggaga 60  
 catggtttct cgctagagaa atcatatcct aaggtcgatg ctttgaagga cgtcatggaa 120  
 gcaatgaagt gaaacgattc aaagtggag aagtcttaag agacttctga aagccgaaga 180  
 ggcaaaacgg agcaatccgt aaagtatgag aaatgaagct gttgaagta aaagctaact 240  
 tgttggttag ttttgaggga ccataaagtc ttctatgggc ttatagctca gctgggttaga 300  
 gcgcacgcct gataagcgtg aggtcgggtg ttcgagtcca cctaggccca ccataaaga 360  
 ttgatattgt gggggtatag ctgagctggg agagcacctg ccttgcaagc aggggggtcag 420  
 cggttcgacc ccgcttacct ccaccataat atatctggtt tctctaattgt ttattatgtt 480



ctttgaaaac tgcacagaga agaagaaaac tgtaattagg ataacatcta aaacctagaa 540  
 gtggcggcaa aaaacgtttg gtcaagctac taagggcgta cgggtggatgc ctaggcgcta 600  
 agagtcgaag aaggacgcgg cgagcggcga aacgccacgg ggagcagtaa gcatgccttg 660  
 atccgtggat atccgaatgg ggcaaccca 689

<210> 15  
 <211> 468  
 <212> DNA  
 <213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 15  
 aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggagt 60  
 tcataaggac tcacactggt ttgtttataa atttgattcg ctgaatttcc agaatcaatc 120  
 acattgaaat cctttggatt tcaattgita attgtgcact gtgaaatgcg aattgataac 180  
 gtgggggtgt agctcagttg ggagagcacc tgccttgcaa gcagggggtc aggagttcga 240  
 ctctcctcat ctccaccaa gacattcata gtttaaatta attatgaatt gtttaaactg 300  
 aacattgaaa actacaaata tacaataaac atgaaatagg tcaagttatt aagggcgtag 360  
 ggcgaatgcc ttggcaccaa gagccgatga aggacgggat aagcaccgat atgcttcggg 420  
 gagtcgcaaa tagacattga tccggagatt tccgaatggg gcaaccca 468

<210> 16  
 <211> 511  
 <212> DNA  
 <213> Acetobacterium woodii

<400> 16  
 aagtcgtaac aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacctcctt tctaaggaaa 60  
 acagggagtc atggtactat tttcttttgt atgaccttta ggttatacaa aaggatcgta 120  
 gtttctggca attttcttta tttttataaa gatgaaaatt gacataaact gcgttagttt 180  
 ttacaccgct catgcgctaa cgcttaatga gctgccaaat tgaaaatttg ggtaaaaacg 240  
 tcaaagtggc cattgaaaac agcatagtgt attaaaaaaa catacaattt cagatgttaa 300  
 caacataaga aaaacgtaag ttaaaggatc gtagttttag gactacaggc gactgacgaa 360

gttctactgt cagttgttaa ggatcaagaa atgaagggca cagggcggat gccttggcac 420  
tcagagccga tgaaggacgc gacaagctgc gaaaagctgc gtgaaggctgc acataaccgt 480  
tgaagcgcag atatccgaat ggggcaaccc a 511

<210> 17  
<211> 471  
<212> DNA  
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 17  
aagtcgtaac aaggtagccg taggggaacc tgcggctgga tcacctcctt tctaagggtgt 60  
aaccttagta tccgaacgca cacatctgct attcagttct gagagggtga cgataacggc 120  
ttcgggccta tagctcagtt cggttagagc gcacgcctga taagcgtgag gtcgttggtt 180  
caattccaac tagggcccacc acgcctctat cgggggtgta gctcagctgg gagagcacct 240  
gctttgcaag caggggggtca tcggttcgaa tccgttcacc tccaccagtt ctttgacaat 300  
cgaatagggtt ttagatcgag gatactcata tatttaggca atcaagctac taagggccta 360  
cgggtggatgc cttggcatcg gaagacgatg aaggacgtgg ttagctgcga taagcctcgg 420  
ggagttgcta aacacactgt gatccgggga tttccgaatg gggcaaccca a 471

<210> 18  
<211> 847  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 18  
ggactggtaa ttgggacgaa gtcgtaacaa ggtagccgta gcggaagctg cggctggatc 60  
acctcctttc taaggataat tggcctcgtg cctattaacc taggtcgata tccgacttaa 120  
aacggatact tctcttttct ttccgctatc caggggttaa ggtgttagtg ttataagggg 180  
ataaaaatta ctttctcctg attgctaacc tgtatctatc ccgctttgaa actcatgtag 240  
gttttgtag gcattttggg ctgaaggact tgcgctaagc gtcctgtttg ctatattata 300  
ttgacgtttt tcgggtagta tttcgaagat acccaatctg tctgttggtta tcaatcgggc 360  
cattagctca gctgggttaga gcgcagtcct gataagactg aggtccttgg ttcgagacca 420

agatggccca ccataaagct aaaacttagc ataatcaaac gaataaaaat acctgctgat 480  
taaccggttt ttcgcgagag aaccggtttt ttataaaga agcaggaaga taatgtctat 540  
tatttcattt taggtgaata acctgcgctg caaattggta tagtttagta ttcaccgggt 600  
tattgggcgg gcaaaaaaat ctttgtgaaa tgaaaatatt tactttaaaa agactgattg 660  
ccggaggtaa tataacagta tgataagtaa tgaagggtca gaaaaagtat tatctccgga 720  
agaacaggct aaattacttg gcctgcttaa agggcggttt gagcaaaata tacaccgcca 780  
cgagggcatt gtttgggcta aggtgcaaga aaagcttaag gcagataccc ttaaattgtg 840  
gtcattg 847

<210> 19  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 19  
aggctgtaag aggcgatgaa ggacgtacta gactgcgata 40

<210> 20  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 20  
gctgtaagag gcgatgaagg acgtactaga ctgcgataag 40

<210> 21  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 21  
cggttggatc acctccttc tagagtatag gggcactatc 40

<210> 22  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 22

gcggttgat cacctccttt ctagagtata ggggcactat

40

<210> 23  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 23  
tgcggttigga tcacctcctt tctagagtat aggggcacta

40

<210> 24  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 24  
ggtcagcggg tgcgtcccg c tattctccac cattttttag

40

<210> 25  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalospirillum multivorans

<400> 25  
gaggtcagcg gttcgatccc gctattctcc accatttttt

40

<210> 26  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 26  
ctggagaagt ctgaagagac ttcgaaatgc cgaagaggca

40

<210> 27  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 27  
agctggagaa gtctgaagag acttcgaaat gccgaagagg

40

<210> 28  
<211> 40

<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 28  
agtctgaaga gacttcgaaa tgccgaagag gcaaagcagg 40

<210> 29  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 29  
tgaagagact tcgaaatgcc gaagaggcaa agcaggggaa 40

<210> 30  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium frappieri

<400> 30  
gaagagactt cgaaatgccg aagaggcaaa gcaggggaaa 40

<210> 31  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Actinomycetales Sm-1

<400> 31  
gcgacgatga tccgcgaaac aagaggacat ggTTTTcttg 40

<210> 32  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Actinomycetales Sm-1

<400> 32  
tgatccgcga aacaagagga catggTTTTc ttgcggtagg 40

<210> 33  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Actinomycetales Sm-1

<400> 33  
caagaggaca tggTTTTctt gcggtagggg ttgttgtgtg 40

<210> 34  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Actinomycetales Sm-1

<400> 34  
tcagcgacga tgatccgcga aacaagagga catggttttc 40

<210> 35  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Actinomycetales Sm-1

<400> 35  
gaggacatgg ttttcttgcg gtaggggttg ttgtgtgttg 40

<210> 36  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 36  
gttttgtcag cgacgatgat cgggaacgaa ggggttgttt 40

<210> 37  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 37  
acgatgatcg ggaacgaagg ggttgtttct tcttccggtta 40

<210> 38  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 38  
tttgtcagcg acgatgatcg ggaacgaagg ggttgtttct 40

<210> 39  
<211> 40  
<212> DNA

<213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 39  
tcagcgacga tgatcgggaa cgaaggggtt gtttcttctt 40

<210> 40

<211> 40

<212> DNA

<213> Rhodococcus rhodococcus

<400> 40  
ggggttgttt cttcttccgg taccggttgt tgtgtgttgt 40

<210> 41

<211> 40

<212> DNA

<213> Xanthobacter flavus

<400> 41  
catcgtgaat agggcattga tcgactgtac cgtggcaaca 40

<210> 42

<211> 40

<212> DNA

<213> Xanthobacter flavus

<400> 42  
acatcgtgaa tagggcattg atcgactgta ccgtggcaac 40

<210> 43

<211> 40

<212> DNA

<213> Xanthobacter flavus

<400> 43  
ggtcttgagc gtcttgtccg cgaatatctg tttcgcattgt 40

<210> 44

<211> 40

<212> DNA

<213> Xanthobacter flavus

<400> 44  
atgacatcgt gaatagggca ttgatcgact gtaccgtggc 40

<210> 45  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Xanthobacter flavus

<400> 45  
ctcttggggt cttgagcgtc ttgtccgcga atatctgttt 40

<210> 46  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium L1

<400> 46  
ggtctggggg gtgtgtttgt gtgcttttga tgtgcagttt 40

<210> 47  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium L1

<400> 47  
gtctgggggg tgtgtttgtg tgcttttgat gtgcagtttc 40

<210> 48  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Mycobacterium L1

<400> 48  
attgtcaggc gattcgttgg atggcccttt cacctgtagt 40

<210> 49  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomicrobium norvegicum

<400> 49  
gcgcccaagc atagcagctt gtgatcattg acagacgaat 40

<210> 50  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomicrobium norvegicum



<400> 50  
cagttcgatc ctgttcacct ccaccatttt ccaactcgac

40

<210> 51  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomicrobium norvegicum

<400> 51  
ctatggcgcc caagcatagc agcttgtgat cattgacaga

40

<210> 52  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomicrobium norvegicum

<400> 52  
tatggcgccc aagcatagca gcttgtgatc attgacagac

40

<210> 53  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomicrobium norvegicum

<400> 53  
actatggcgc ccaagcatag cagcttgtga tcattgacag

40

<210> 54  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium dehalogenans

<400> 54  
acggagtgga aaaatgccga agaggcaaaa cggagcaatc

40

<210> 55  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium dehalogenans

<400> 55  
cacggagtgg aaaaatgccg aagaggcaaa acggagcaat

40

<210> 56  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium dehalogenans

<400> 56  
tatccacgga gtggaaaaat gccgaagagg caaaacggag 40

<210> 57  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium dehalogenans

<400> 57  
agcatgagca gaagccatag ttgacttatc cacggagtgg 40

<210> 58  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 58  
ctggagaagt ctatagagac ttcgaagtgc cgaagaggca 40

<210> 59  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 59  
agctggagaa gtctatagag acttcgaagt gccgaagagg 40

<210> 60  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 60  
agtctataga gacttcgaag tgccgaagag gcaaagcagg 40

<210> 61  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 61  
tatagagact tcgaagtgcc gaagaggcaa agcaggggaa

40

<210> 62  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium hafniense

<400> 62  
atagagactt cgaagtgccg aagaggcaaa gcaggggaaa

40

<210> 63  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 63  
ggtcaagtta ttaagggcaa aggggtggatg ccttggcact

40

<210> 64  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 64  
gtgcggctgg atcacctcct ttctaaggag aaaggctttt

40

<210> 65  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 65  
gtgccaaggc atccaccctt tgcccttaat aacttgacct

40

<210> 66  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 66  
ctcctagtgc caaggcatcc accctttgcc cttataact

40

<210> 67

<211> 40  
<212> DNA  
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 67  
gcggctggat cacctccttt ctaaggagaa aggcttttac 40

<210> 68  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Clostridium formicoaceticum

<400> 68  
cctagtgccca aggcatccac cctttgccct taataacttg 40

<210> 69  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 69  
ctgtcaggag taaggagaga agagtgagga gtacacctca 40

<210> 70  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 70  
gtgacacgcg aaggtagcaa cacgatcgct taagtagaag 40

<210> 71  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 71  
gagtaaggag agaagagtga ggagtacacc tcaccctaac 40

<210> 72  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 72

aggagtaagg agagaagagt gaggagtaca cctcaccta

40

<210> 73  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 73  
agtaaggaga gaagagtgag gagtacacct caccctaacg

40

<210> 74  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfuromonas chloroethenica

<400> 74  
gacacgcgaa ggtagcaaca cgatcgctta agtagaagac

40

<210> 75  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Acetobacterium woodii

<400> 75  
ttaacgggac aaataccgga gtagtggttag cagggtcccaa

40

<210> 76  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Acetobacterium woodii

<400> 76  
ccggagtagt ggtagcaggt cccaatcgat cattgaaaac

40

<210> 77  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Acetobacterium woodii

<400> 77  
gacaaatacc ggagtagtgg tagcaggtcc caatcgatca

40

<210> 78  
<211> 40

<212> DNA  
<213> Acetobacterium woodii

<400> 78  
ttttaacggg acaaataccg gagtagtggt agcaggtccc 40

<210> 79  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Acetobacterium woodii

<400> 79  
ttttaacggga caaataccgg agtagtggtg gcaggtccca 40

<210> 80  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalobacter restrictus

<400> 80  
aaggtcaaga tataaagggc atacggtgga tgccttggcg 40

<210> 81  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalobacter restrictus

<400> 81  
gaaggtcaag atataaaggc catacgggtg atgccttggc 40

<210> 82  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalobacter restrictus

<400> 82  
aagatataaa gggcatacgg tggatgcctt ggcgccaaga 40

<210> 83  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalobacter restrictus

<400> 83  
gcgcgtggca aatttgaact taggagcatc tatgctccgt 40

<210> 84  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalobacter restrictus

<400> 84  
tcaagatata aaggcatac ggtggatgcc ttggcgccaa 40

<210> 85  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalobacter restrictus

<400> 85  
tcgcgcgtgg caaatitgaa cttaggagca tctatgctcc 40

<210> 86  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalobacter restrictus

<400> 86  
cgcggtggcaa atttgaactt aggagcatct atgctccgtc 40

<210> 87  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 87  
gtccacctag gccaccata aaagattgat attgtggggg 40

<210> 88  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 88  
agattgatat tgtgggggta tagctcagct gggagagcac 40

<210> 89  
<211> 40  
<212> DNA

<213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 89  
attgatattg tgggggtata gctcagctgg gagagcacct 40

<210> 90

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 90  
agagacttct gaaagccgaa gaggcaaac ggagcaatcc 40

<210> 91

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium sp. strain PCE1

<400> 91  
gacttctgaa agccgaagag gcaaacgga gcaatccgta 40

<210> 92

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 92  
atgcgaattg ataacgtggg ggtgtagctc agttgggaga 40

<210> 93

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 93  
ggataagcac cgatatgctt cggggagtcg caaatagaca 40

<210> 94

<211> 40

<212> DNA

<213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 94  
gatatgcttc ggggagtcgc aaatagacat tgatccggag 40



<210> 95  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 95  
gcaccgatat gcttcgggga gtcgcaaata gacattgatc 40

<210> 96  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfitobacterium frappieri TCE1

<400> 96  
gcactgtgaa atgcgaattg ataacgtggg ggtgtagctc 40

<210> 97  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Acetobacterium woodii

<400> 97  
gtcagttggtt aaggatcaag aatgaaggg cacagggcgg 40

<210> 98  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Acetobacterium woodii

<400> 98  
gttggttaagg atcaagaaat gaagggcaca gggcggatgc 40

<210> 99  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Acetobacterium woodii

<400> 99  
ttgttaagga tcaagaaatg aagggcacag ggcggatgcc 40

<210> 100  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 100  
gattgtcaaa gaactggtg aggtgaacgg attcgaaccg 40

<210> 101  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 101  
cgattgtcaa agaactggtg gaggtgaacg gattcgaacc 40

<210> 102  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 102  
gtcaacctct cagaactgaa tagcagatgt gtgcgttcgg 40

<210> 103  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 103  
taaccgaact gagctatagg cccgaagccg ttatcgtaa 40

<210> 104  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 104  
cgtcaacctc tcagaactga atagcagatg tgtgcgttcg 40

<210> 105  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Desulfomonile tiedjei DCB-1

<400> 105  
ccgaagccgt tatcgtcaac ctctcagaac tgaatagcag 40

<210> 106  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 106  
tgagcaaaat atacaccgcc acgagggcat tgtttgggct 40

<210> 107  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 107  
ttatcaatcg ggccattagc tcagctgggt agagcgcagt 40

<210> 108  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 108  
cgtcacgtca tgaaagccgg taacacttga agtcgatgtg 40

<210> 109  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 109  
gccgcggtaa tacgtaggaa gcaagcgta tccggattta 40

<210> 110  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 110  
atatttgggct gaaggacttg cgctaagcgt cctgtttgct 40

<210> 111  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 111  
ctggatcacc tcctttctaa ggataattgg cctcgtgcct 40

<210> 112  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 112  
gtccttggtt cgagaccaag atggcccacc ataaagctaa 40

<210> 113  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 113  
ggactggtaa ttgggacgaa gtcgtaacaa ggtagccgta 40

<210> 114  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 114  
tgtttggtaa agtcctgcaa cgagcgcaac ccttggtgct 40

<210> 115  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Dehalococcoides ethenogenes 195

<400> 115  
gtcctgataa gactgaggtc cttggttcga gaccaagatg 40

<210> 116  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Sense primer 27F for PCR

<400> 116  
agagtttgat cctggctcag 20

<210> 117  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Antisense primer 132R for PCR

<400> 117  
gggttbcccc attcrg

16

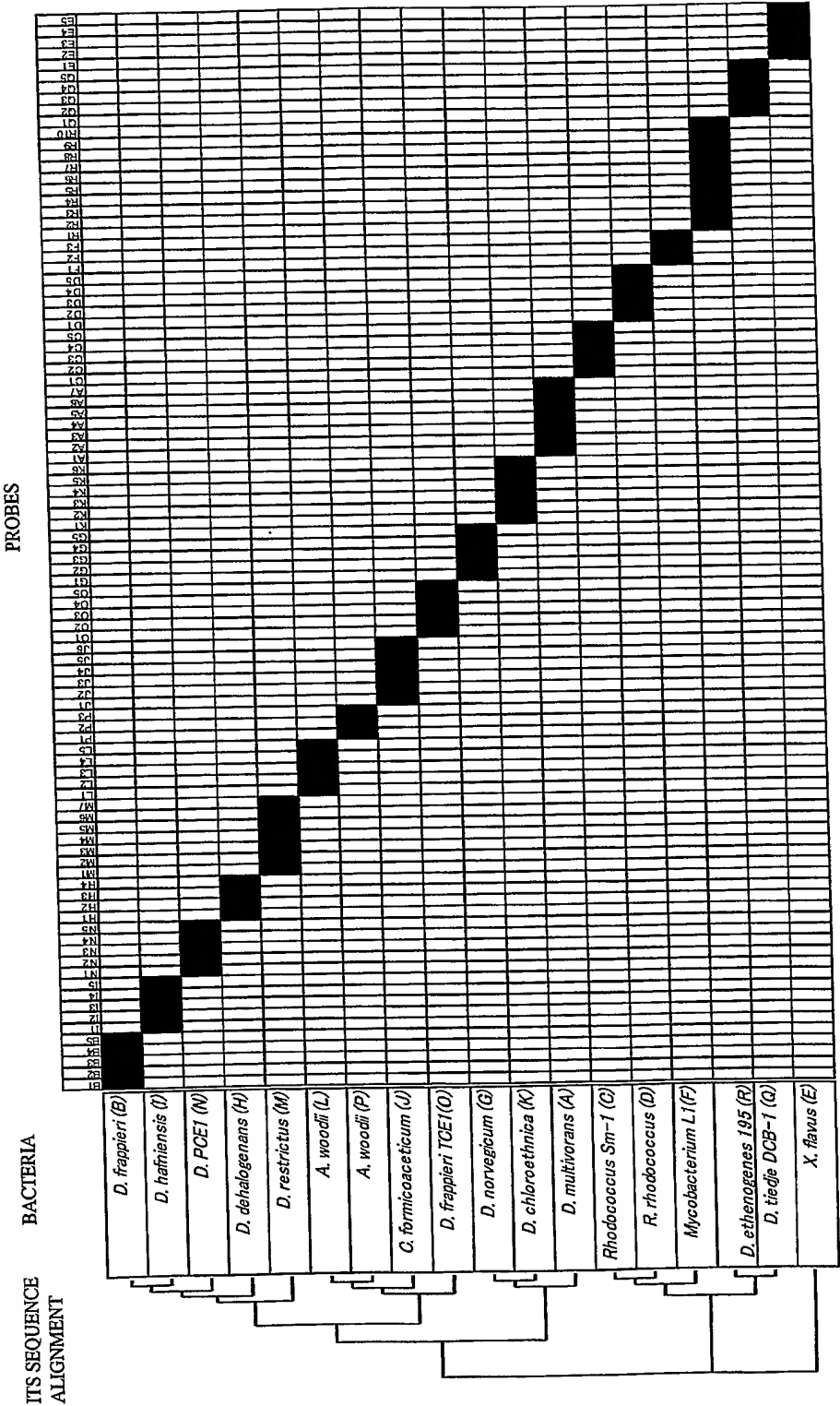
<210> 118  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Antisense primer 341R for PCR

<400> 118  
caatgaccac aatttaaggg

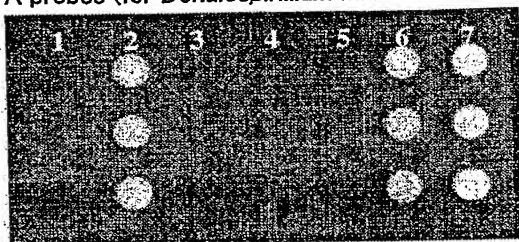
20

【書類名】 図面  
【図 1】

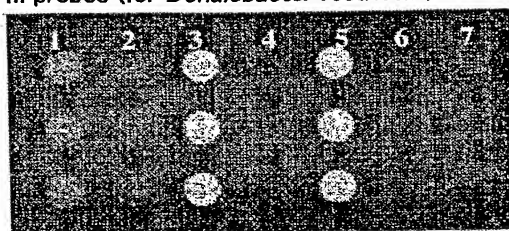


【図 2】

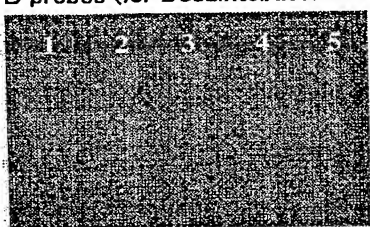
A probes (for *Dehalospirillum multivorans*)



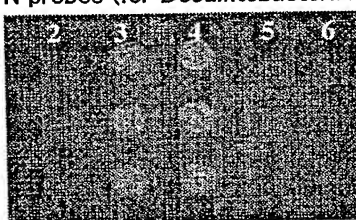
M probes (for *Dehalobacter restrictus*)



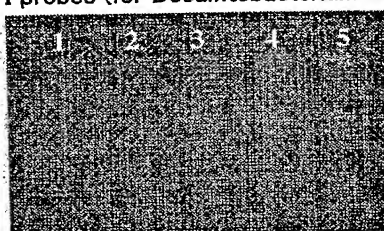
B probes (for *Desulfitobacterium frappieri*)



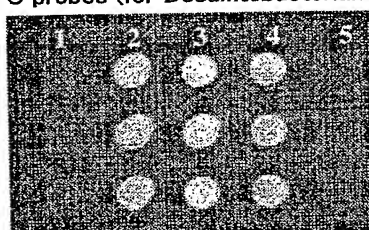
N probes (for *Desulfitobacterium* PCE1)



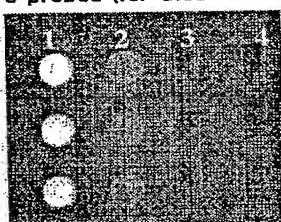
I probes (for *Desulfitobacterium hafniense*)



O probes (for *Desulfitobacterium frappieri* TCE1)

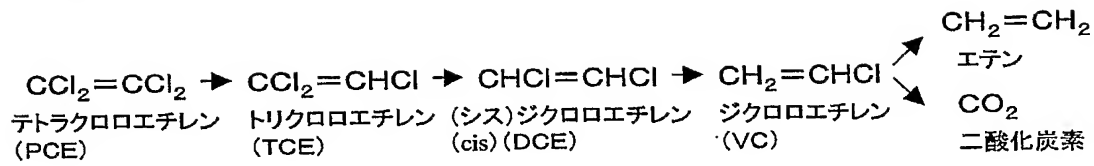


J probes (for *Clostridium formicoaceticum*)



【図 3】

A



B

<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195 R	PCE → TCE → DCE → VC → ethene
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> B	PCE → TCE → cisDCE
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> I	
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> H	
<i>Desulfitobacterium</i> sp. strain PCE1 N	
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> TCE1 O	
<i>Desulfomonile tiedjei</i> DCB-1 Q	
<i>Desulfuromonas chloroethenica</i> K	PCE → TCE → DCE
<i>Acetobacterium woodii</i> L	PCE → TCE
<i>Acetobacterium woodii</i> P	
<i>Clostridium formicoaceticum</i> J	PCE → TCE
<i>Dehalobacter restrictus</i> M	PCE → cisDCE
<i>Dehalospirillum multivorans</i> A	PCE → cisDCE
<i>Desulfomicrobium norvegicum</i> G	PCE → cisDCE
<i>Rhodococcus</i> sp. Sm-1 C	DEC, VC → CO <sub>2</sub>
<i>Rhodococcus rhodococcus</i> D	
<i>Xanthobacter flavus</i> E	DCE, VC → CO <sub>2</sub>
<i>Mycobacterium</i> L1 F	VC → CO <sub>2</sub>



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 P C E 分解関連バクテリアの検出に使用できる新規なポリヌクレオチドの提供を目的とする

【解決手段】

前記目的を達成するために、本発明のポリヌクレオチドは、17種の嫌気性 P C E 分解関連バクテリアの 16S-23S Internal Transcribed Spacer ( I T S ) 領域に由来する、前記 17 種のバクテリアに特異的なポリヌクレオチドであって、配列番号 1 から 17 のいずれかの塩基配列に由来するポリヌクレオチド、または、配列番号 19 から 105 のいずれかの塩基配列に由来するポリヌクレオチドである。

【選択図】図 1

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)  
【提出日】 平成16年 6月 3日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【事件の表示】  
    【出願番号】 特願2004- 50082  
【承継人】  
    【識別番号】 304019399  
    【住所又は居所】 岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1  
    【氏名又は名称】 国立大学法人岐阜大学  
    【代表者】 学長 黒木登志夫  
    【連絡先】 部署名 学術情報部 産学連携課 担当者 知的財産係長 武田  
                正 電話番号 0 5 8 - 2 9 3 - 2 0 8 8 (ダイヤルイン)  
【その他】 1 5 文科会第 1 9 9 9 号に基づく承継

特願 2 0 0 4 - 0 5 0 0 8 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 9 1 0 1 2 2 5 7 ]

1. 変更年月日

1 9 9 1 年 1 月 2 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1

氏 名

岐阜大学長

特願 2 0 0 4 - 0 5 0 0 8 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 1 0 2 1 5 3 3 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

特願 2 0 0 4 - 0 5 0 0 8 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 1 2 6 1 3 3 6 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 3 月 2 6 日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府吹田市垂水町 3 丁目 2 8 番 3 3 号

氏 名

松下環境空調エンジニアリング株式会社

特願 2 0 0 4 - 0 5 0 0 8 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 4 0 1 9 3 9 9 ]

1. 変更年月日

2 0 0 4 年 4 月 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1

氏 名

国立大学法人岐阜大学